

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-132093

(43) 公開日 平成7年(1995)5月23日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9359-4B		
9/12				
// (C 1 2 N 9/12				
C 1 2 R 1:19)		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			審査請求	未請求 請求項の数8 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平5-306095

(22) 出願日 平成5年(1993)11月12日

(71) 出願人 593220823

伊達 孝保

石川県金沢市菊川一丁目19番12号

(71) 出願人 000003126

三井東圧化学株式会社

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(72) 発明者 伊達 孝保

石川県金沢市菊川一丁目19番12号

(72) 発明者 栗屋 昭

神奈川県横浜市戸塚区戸塚町4978

(74) 代理人 弁理士 若林 忠

(54) 【発明の名称】 新規な蛋白質およびその遺伝子

(57) 【要約】

【目的】 新たな遺伝子クローニング方法を用いてクローニングされた新たなキナーゼ遺伝子の提供。新たなプロテインキナーゼの提供。

【構成】  $\lambda$ gt11 cDNAライブラリーを大腸菌に感染させた後、IPTGで $\beta$ -ガラクトシダーゼとヒトcDNA由来の蛋白の融合蛋白の発現を誘導させ、そのキナーゼ活性をメンブラン上で $[\gamma-32P]$  ATPの32p取り込み活性で測定する。

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 基質を塗布した膜上に、原核生物で発現させたタンパク質を吸着させ、該基質へのATPの $\gamma$ 位リン酸基の取り込み活性を測定することにより、キナーゼ活性を検索することを特徴とする、新たなキナーゼタンパク質をコードする遺伝子のクローニング方法。

【請求項2】 請求項1の遺伝子のクローニング方法によりクローニングされた新たなキナーゼ遺伝子。

【請求項3】 新たなキナーゼ遺伝子がプロテインキナーゼ遺伝子である請求項2のキナーゼ遺伝子。

【請求項4】 新たなキナーゼ遺伝子がポリヌクレオチドキナーゼ遺伝子である請求項2のキナーゼ遺伝子。

【請求項5】 図1記載のアミノ酸配列を部分配列として有する新たなプロテインキナーゼPKU $\alpha$ および図1記載のアミノ酸配列を有するPKU $\beta$ 、およびそれらの一部断片ペプチド。

【請求項6】 図1記載の塩基配列を有する遺伝子および一部DNA断片、およびこれに相補的なセンスRNAおよびアンチセンスRNA。

【請求項7】 PKU $\alpha$ およびPKU $\beta$ およびそれらの一部断片ペプチドに対する抗体。

【請求項8】 請求項5のPKU $\alpha$ およびPKU $\beta$ の全部あるいは一部の遺伝子あるいは請求項6のPKU $\alpha$ およびPKU $\beta$ 全体あるいは断片に対する抗体を用いて、クローニングすることのできる、PKU $\alpha$ およびPKU $\beta$ に配列の相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子および該タンパク質。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新たなタンパク質およびその遺伝子に関するものであり、更に詳しく言えば新たなプロテインキナーゼまたはポリヌクレオチドキナーゼおよびその遺伝子また遺伝子断片、更に遺伝子組換えにより該遺伝子を発現させる方法、該プロテインキナーゼおよび一部断片ペプチドに対する抗体、更に該プロテインキナーゼの生体における機能解析による医薬・診断薬としての応用に関する。

##### 【0002】

【従来の技術】 キナーゼは従来、フルクトキナーゼ、プロテインキナーゼCをはじめとして、数百種類ほど発見されてきており、様々な生体内基質、たとえばタンパク質、核酸、糖類、脂質類およびそれらの成分、また低分子量生体物質をリン酸化する酵素として、細胞の分裂、増殖、分化、細胞内情報伝達系、エネルギー変換系、重合系、分解系などに関わり、生体にとりきわめて重要な酵素である。またプロテインキナーゼは、ATPの $\gamma$ 位のリン酸基を特定の蛋白質の特定のセリン、スレオニン、あるいはチロシン残基に転移する酵素で、その役割は、a. 糖や脂質などの代謝調節、b. 細胞分裂、細胞増殖、あるいは細胞周期の調節、c. 情報伝達、d. そ

他の生体反応に関与していることが知られており、現在、ヒトでは100前後のプロテインキナーゼの存在が報告されている。

##### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 未解明の生命現象、たとえば重合、分解、代謝などの生体反応系、生体内情報伝達系、生体機能応答系、更には各種疾患の発現、発症の原因等を明らかにするには、新たな各種のキナーゼの発見が必須である。新たなキナーゼの発見には、従来は、各種の動植物組織、微生物よりキナーゼ活性を有する分画を精製し、キナーゼを単離する方法が通常用いられてきたが、数百のキナーゼが発見されている今日、新たなキナーゼの存在量は微量であり、従来法で単一分離し、化学構造を決定し、またその機能を明らかにするまでには多大な労力と時間を要する。

【0004】 各種キナーゼ、中でも特にプロテインキナーゼC (PKC) を代表とするプロテインキナーゼ類の生体内での重要性が明らかにされた現在、最近の遺伝子工学的技術・手法を用いて、PKCなどの遺伝子あるいはその一部DNA断片をプローブとして用いて、あるいはプロテインキナーゼの保存配列を利用したPCR法により、新しいプロテインキナーゼ類遺伝子をクローニングする研究がさかんになっているが、化学構造上ホモロジーの高いプロテインキナーゼをコードする遺伝子をクローニングできるのにとどまっており、従来のプロテインキナーゼとは相同性の低い新たな未知のキナーゼの発見はなかなか困難であった。

【0005】 本発明はかかる現状に鑑み、新たなキナーゼ類の発見のために、該キナーゼをコードする遺伝子をクローニングする遺伝子工学的操作を行う際、なんらかの工夫を導入して行うべく鋭意検討した結果、キナーゼ活性測定法を導入することを想到し本発明に到達した。即ち本発明は新たなキナーゼ類をコードする遺伝子をクローニングする新たなクローニング方法を提供するものである。またこの新たな遺伝子クローニング方法を用いてクローニングされた新たなキナーゼ遺伝子を提供するものである。本発明はさらに、新たなプロテインキナーゼ遺伝子がコードする新たなプロテインキナーゼ $\alpha$  (PKU $\alpha$ ) およびプロテインキナーゼ $\beta$  (PKU $\beta$ ) を提供する。またPKU $\alpha$ タンパク質およびPKU $\beta$ タンパク質、またそれらの一部断片ペプチドに対する抗体を提供する。さらに、本発明はPKU $\alpha$ 、PKU $\beta$ をコードする遺伝子、およびそれらの一部DNA断片等、あるいはまた上記のPKU $\alpha$ 、PKU $\beta$ 関連の抗体等を用いて、クローニングすることのできる、PKU $\alpha$ およびPKU $\beta$ に配列の相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子および該タンパク質を提供するものである。

##### 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、キナーゼ活性測定法を導入することにより新しいヒトのプロテ

ンキナーゼの遺伝子をクローニングすることに成功した。このクローニング法は、 $\lambda$ gt11 cDNAライブラリーを大腸菌に感染させた後、IPTGで $\beta$ -ガラクトシダーゼとヒトcDNA由来の蛋白の融合蛋白の発現を誘導させ、そのキナーゼ活性をメンブラン上で [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATPの32p取り込み活性で測定するというものでActivity cloningと呼ぶことにする。メンブラン上に、5'を脱リン酸化したDNAを塗布し、プロテインキナーゼ遺伝子だけでなく、ポリヌクレオチドキナーゼ遺伝子もクローニング出来るようにした。大腸菌のプロテインキナーゼ、ポリヌクレオチドキナーゼはNADPH依存性なので、NADPH非存在下であるこのような方法により、得られるプロテインキナーゼ活性を示す酵素はすべてライブラリーcDNA由来の酵素タンパク質ということになる。

【0007】このようにして、キナーゼ活性を示すクローンをヒトtestisのcDNAライブラリーより発見することに成功した。塩基配列解析により、その遺伝子は $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子に2kbのcDNAが結合していた。cDNA中には、372個のコドンが $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子とフレームを合わせ、しかもそのアミノ酸配列にはプロテインキナーゼの触媒部位特有のモチーフが存在していた。

【0008】そこで、この融合蛋白プロテインキナーゼで、リン酸化を受けた物質を加水分解し、解析を行ったところ、生成物はヌクレオチドではなく、主として約3/4がリン酸化スレオミン、1/4がリン酸化セリン残基であった。すなわち、融合蛋白はThr/Serプロテインキナーゼであった。RNA解析からmRNAの大きさは3.5kb、どの組織でも発現していることから、ubiquitousな遺伝子であるが、強いといえば、発現量は筋肉組織で最も高く、続いて胎盤で多く、逆に脳、肺、肝臓では比較的少なかった。この遺伝子の転写産物がどの臓器にもあること (ubiquitous)

制御領域

NH<sub>2</sub> ===== COOH

またPKU $\beta$ はPKU $\alpha$ と同様、どの臓器でも発現しているが、腎臓と胎盤で比較的好く発現し、肺、脳、心臓、肝臓では低い。

【0012】ついでこの2つの蛋白の機能を明らかにするために、まずそれぞれのC-末端ペプチド、AIAS TSGASNNSSSN (PKU $\alpha$ )とMAGLTAS PTPSSSIITY (PKU $\beta$ )を合成し、ポリクローナル抗体を作製した。PKU $\alpha$ およびPKU $\beta$ の各断片ペプチドを用いて、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製することができる。

【0013】PKU $\alpha$ を用いてPKU $\beta$ 遺伝子をクローニングできたのと同様に、PKU $\alpha$ と相同性の高い、他の新たなプロテインキナーゼ遺伝子をクローニングすることもできる。

ous)から、この遺伝子をPKU $\alpha$ 、また蛋白質をPKU $\alpha$ と命名した。

【0009】PKU $\alpha$ は3'末端に20個のポリA尾部とポリアデニル化のシグナル配列を持っていることから、最初のクローン ( $\lambda$ pkT-1, 2.06KbのcDNA)は3'側は完全に含まれているものの、まだ5'端側、約1.5kbがクローニングされていなかった。そこで $\lambda$ pkT-1をプローブに5'端側のクローニングを行ったところ、5'側に約0.5kb延びたクローンが得られた。しかし、5'端側約800bpがまだクローニングされていない(現在この部分ひきつづきクローニング中)。現在PKU $\alpha$ は540以上のアミノ酸残基まで明らかにされているが、RNAの大きさから、おそらく800前後のアミノ酸残基からなる蛋白と考えられる。PKU $\alpha$ は、ヒト染色体の17番にマップされた。

【0010】さらに、本発明者らは、PKU $\alpha$ ファミリーのクローニングを試みたところ、胎盤のcDNAライブラリーより、相同性が非常に高いクローンを得ることができ、この遺伝子を取りあえず、PKU $\beta$ と命名した。PKU $\beta$ のmRNAは、PKU $\alpha$ のそれより大きく、約4.0kbで、コードされている蛋白質のアミノ酸残基も787で、PKU $\alpha$ より大きいと推定される。今までにPKU $\alpha$ で明らかにされた540アミノ酸残基を比較してみると、この2つは相同性が極めて高く、N-末端とC-末端を除くと90%近い同一性がある。HEL A、A431の培養細胞には、PKU $\beta$ とPKU $\alpha$ ともに発現しており、ややPKU $\beta$ の方がPKU $\alpha$ より高い発現が見られた。塩基配列からこの蛋白質はかなりの塩基性蛋白で膜貫通ドメインを持っていないことから可溶性蛋白と考えられ、両者ともに、ペプチドのN-末端側はキナーゼの制御領域、C-末端側は、触媒領域である可能性が高い。

【0011】

触媒領域

【0014】本Activity cloning方法ではメンブラン上に、5'を脱リン酸化したDNAを塗布しており、ポリヌクレオチドキナーゼ遺伝子もクローニングできる。またDNAを結合させずに、目的とするキナーゼの基質を塗布することにより、目的とするキナーゼ遺伝子をクローニングすることができる。

【0015】キナーゼ類を発現させる生物種としては、大腸菌等の原核生物が適当であり、酵母や動物細胞等親核生物細胞は適当ではない。

【0016】本発明を、以下実施例をもってより詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0017】

【実施例】

【実施例1】

#### cDNA由来蛋白のトランスファー

human testis placenta melanomaの三種類の $\lambda$ gt11 cDNAライブラリーはclontechより購入した。 $\lambda$ gt11を常法に従ってE. coli Y1090株に感染させ、寒天培地に $5 \times 10^5$  プラーク/プレートでひろげた。寒天は、BRL社のLMPアガロース (Electrophoresis grade) を用いた。プラークが見え始めたところでプレートを取り出し、アガロースの上に10mM IPTGに浸したDNA結合N-bond filterをかぶせ、フィルターをのせたままさらに、37℃で4時間培養して誘導された蛋白質をフィルターにトランスファーした。プレートにはさらに別のN-bond filterを置き一夜で37℃で保温しレプリカを作製した。

【0018】なおN-bond filter (Amersham) は、ポリヌクレオチドキナーゼ遺伝子をクローニングする目的で、calif thymus DNAをDNase Iで処理して100-300bpに断片化し、続いてアルカリフォスファターゼ処理して5'の燐酸基を取り除いたDNA、300 $\mu$ g/ml (10mM Tris-HCl, pH8.0, 100mM NaCl) にN-bond filterを浸し、生乾きにしたものを用いた。T4 ポリヌクレオチドキナーゼをこの上に置き、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ と反応させると0.0005 unitまで検出可能であった。フィルターをLMPアガロースの上に置いておいても活性は損なわれない。

【0019】通常の寒天は勿論、その他のタイプの電気泳動用のアガロースを用いても、フィルターに不純物が染み込み、活性を大幅に低下した。

#### 【0020】【実施例2】

##### 活性測定

フィルターを0.2% Triton X-100 TB Sで2回軽くリンスして水滴を取り、サランラップに置いた50mMコハク酸-NaOH buffer (pH 5.5)、10mM  $\text{MgCl}_2$ 、2MBq  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 、1% sodium Azide 1ml (フィルター8枚分) に置いて、蒸発防止のためにさらにその上にサランラップをかけて、37℃1-2時間反応させた。反応後、フィルターを0.2% SDS-0.1% SSC室温で2回リンスした後、さらに65℃で同じ液で3回リンスした。乾燥後、X線フィルムに置き-80℃で4日感光させた。レプリカにも同様の反応を行い、2つに見えた点を取りだして2ndクローニングに用いた。こうして強いキナーゼ活性を持つクローンをtestisのライブラリーより得た。

#### 【0021】【実施例3】

##### 塩基配列の決定

2ndでもpositiveであったクローンを増や

し、EcoRI断片をpTD-T7にクローニングし、cDNA部分を $\lambda$ pkT-1と命名し、RIを用いたSanger法で塩基配列を決定した(図1)。

【0022】 $\lambda$ pkT-1は、両端に3塩基のリンカーに囲まれた2060bpからなるDNAで、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の1007番目のコドンに( $\lambda$ gt11ライブラリーは全てこの配列を持つ) フレームを合わせて372個のコドンが、また、3'側には20個のアデニンヌクレオチドからなるpoly A tailがあった。cDNA中のopen reading frame (以下ORFという) には、Hanksらが (Steven K. Hanks, Anne Marie Quinn & Tony Hunter; Science (1988) 241, 42-52) 明らかにした8つのプロテインキナーゼ保存ドメインがあり、アミノ酸配列からも $\lambda$ pkT-1にコードされている蛋白質がキナーゼ活性を持つことが明らかにされた。

#### 【0023】【実施例4】

##### 融合蛋白の特徴づけ

Y1089株に $\lambda$ pkT-1を持つファージを感染させて溶原菌を作り、この菌にIPTGで誘導させて融合蛋白を合成し活性を調べたところ活性が非常に弱く、そのためこの粗抽出液をferrellとMartinの方法 (J. E. Ferrell & G. S. Martin, J. Biol. Chem., 264, p20723-20729) にしたがって、SDS-polyacrylamide gel電気泳動して、蛋白質をN-bond filterにトランスファーし、キナーゼ活性を見たところ、140KD付近に強い $^{32}\text{P}$ 取り込み活性を示した。活性はpH8.0で非常に強く、この蛋白を0.1N HClで分離し薄層クロマトで展開したところ、燐酸化スレオニンが強く、燐酸化セリンがその1/5程度検出され、燐酸化チロシンは全く検出されなかった。このことからクローニングした遺伝子の生産物はThr/Serプロテインキナーゼであることが判明した。

#### 【0024】【実施例5】

##### PKU $\alpha$ 遺伝子

$\lambda$ pkT-1をプローブにしてcDNAをスクリーニングしたところ、短い断片のみしかクローニングできなかった。そこで、ライブラリーのcDNAをPCRし、5'側に450bp長いクローンを、melanomaから得られたのでこれをプローブにcDNA 5'端を500bp近く長いクローンを拾うことが出来た(図2)。しかし、5'に断定できる翻訳開始コドンが見あたらないため、pkM-1クローンの5'に近いところのオリゴマーを合成し、これをプライマーにHeLa cellより得た精製mRNAより5'側上流のcDNAを作り、clontech社の5'-AmplifierでPCR増幅して、さらに750bpの断片を

得ることが出来た（塩基配列は現在解析中）。

#### 【0025】【実施例6】

PKU $\beta$ の発見

PKU $\alpha$ ファミリーが無いかを知るために $\lambda$ pkT-1をプローブに、胎盤cDNAライブラリーより遺伝子をクローニングしていったところ、30ケのクローンを拾うことが出来た。このうち少なくとも6ケ同じグループで、塩基配列の結果、コーディング領域と考えられる塩基配列、それから推測されるアミノ酸配列は、PKU $\alpha$ と等しいhomologyがあったので（図3）これらのクローンをPKU $\beta$ と命名した（蛋白の分子量がわかった時点で名前を変更する可能性あり）。他のクローンは、PKU $\alpha$ と有意なhomologyは見いだせることは出来なかった。

【0026】PKU $\beta$ のcDNAには、787のアミノ酸残基をもつORFがあり、プロテインキナーゼのドメインは蛋白でいえばC-末端側に近い領域にある。この蛋白PKU $\beta$ は塩基性で膜貫通ドメインを持っていない。現在PKU $\beta$ は、3' 端側の非翻訳領域がまだクローニングされていない。

#### 【0027】【実施例7】

RNA解析1

HeLaとA431細胞から得られたoligo dT column精製のmRNAをノーザンブロット解析を行ったところ、PKU $\alpha$ は3.5kb、PKU $\beta$ は、約4.0kbで、この2つの細胞における顕著なmRNA含量の違いは見られず、またPKU $\alpha$ とPKU $\beta$ のmRNA量は同じ程度か、あるいは、PKU $\beta$ の発現の方がPKU $\alpha$ より高いという傾向が見られた。

#### 【0028】【実施例8】

RNA解析2

Clontech社のMultiple Tissue Northern (MTN) Blotを使用して臓器（胎児）におけるmRNA発現量の違いを調べたところ、PKU $\alpha$ 、PKU $\beta$ ともにどの臓器でも発現している。PKU $\alpha$ の発現は筋肉で顕著に、続いて胎盤で高いのに対しPKU $\beta$ は腎、脾臓、胎盤で比較的高いという臓器特異性が認められた。脳、肺、肝臓においては、どちらの発現も低かった。

【0029】なお、PKU $\alpha$ 遺伝子はClontech社のパイオース・クロモゾームローカライゼーションキットによりヒト染色体17番にマップされた。

#### 【0030】【実施例9】

PKU $\alpha$ 遺伝子およびPKU $\beta$ 遺伝子の他のクローニング方法

【実施例1】でDNA結合N-bond filterのかわりにDNAを結合していないN-bond filterを用い、また【実施例2】で50mMコハク酸-NaOH buffer (pH5.5)のかわりに、50mMトリス-HCl buffer (pH7.5)

を使う以外は、以下同様の操作により実施できた。

#### 【0031】

【発明の効果】新たなプロテインキナーゼ等キナーゼ類の発見は、生体の細胞分裂、発生、増殖・分化、細胞死、がん化などの生命現象の本態の解明に役立つ。即ち生命現象の未知のpathwayを明らかにし、細胞内情報伝達系、タンパク質間相互作用、各生物物質の代謝過程等々の詳細な理解に道を開く。本発明の新たなプロテインキナーゼタンパク質、およびそれに対する抗体、さらに該タンパク質をコードする遺伝子、またその一部DNA断片、センスRNA、アンチセンスRNAなどのプローブは、生命現象にまつわる各種疾患、即ち心臓血管系、神経系、がん、免疫疾患、内分泌疾患等々の発現、発症、進展に対する診断・予防・治療に有用である。また本プロテインキナーゼに対する活性化剤、阻害剤の探索は新たな医薬・診断薬のジャンルを形成することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】PKU $\alpha$ とPKU $\beta$ のcDNAの塩基配列とその比較、および該塩基配列から推測されるアミノ酸配列とその比較を示した図でありかつ図1Aから図1Eまで連続している。

【図2】PKU $\alpha$ のcDNAクローンを示した図である。

【図3】PKU $\beta$ のcDNAクローンを示した図である。

#### 【符号の説明】

図1. PKU $\alpha$ とPKU $\beta$ のcDNAの塩基配列とその比較、および該塩基配列から推測されるアミノ酸配列とその比較。—は同一のアミノ酸を示し、...は欠失を表わす。I~VIIIはHanksとQuinnが報告しているプロテインキナーゼの保存領域で[S. K. Hanks and A. M. Quinn (1991) Methods in Enzymology vol. 200 p 38-62]、波線の下線で示した。網かけしたアミノ酸は中でも特に保存性が高いものを示す。 $\lambda$ pkT-1の遺伝子では、||より3'側の領域が含まれていた。AATAAAはポリアデニル化シグナル配列。

図2. PKU $\alpha$ のcDNAクローン。\*は制限酵素部位を示す。S, SphI; N, NcoI; Hp, HpaI; B, BglII; C, ClaI; Hd, HindIII  
図3. PKU $\beta$ のcDNAクローン。\*は制限酵素部位を示す。S, SmaI; B, BamHI; Hd, HindIII; Hc, HincII; BaI, BclI; P, PstI; Pv, PvuII; RV, EcoRVを、=はIntronを示す。AvaI (2) CYCGRG 284, 1173 BclI TGGCCA701 BamHI GGATCC 377 EcoRV GATATC 1993 DraI (2) TTTAAA 1162, 2437 HhaI GCGC1201 Hi

ncII GTYRAC 1445 HindIII 50  
9 PstI CTGCAG 1790 PvuII C  
AGCTG 2454 SmaI CCGGG 284  
AccI, BglII, ClaI, Rl, HpaI, K

【図1A】

PKUβ 33 CTCTTCTCTGCG CTGCTCTCTCTGCG CTCTCTCTCTCTGCG  
PKUβ 93 CCGAGCTCTGCTCT CTCTCTCTCTCTGCG CCGAGCTCTCTGCG  
PKUβ 153 CCGAGCTCTGCTCT CCGAGCTCTCTGCG CCGAGCTCTCTGCG  
1 SVVDS SSSGSL EGPSS VSOIS  
PKUβ 213 ATGAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
21 TSTPT GSA AARSLL NHTPP  
PKUβ 273 AGCTCTCTCTGCG CCGAGCTCTCTGCG CCGAGCTCTCTGCG  
41 SGRPREOAMD ELHSL DPRRO  
PKUβ 333 TCGAGCTCTGCG AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
61 LLEA RFTGV ASGST GSTGS  
PKUβ 393 GAGTCTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
81 CSYGA KASTN WESSN HSFSS  
PKUβ 453 TCGAGTCTGCG AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
101 LESLS DESE TPEKK OSESS  
PKUβ 513 TCGAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
121 RGRKR KAEHQ HEVSO GFPHL  
PKUβ 573 AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
141 PVFQSLATWE HGRTA GGSKI  
PKUβ 633 CCGAGTCTGCG AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
161 GGRGH KISDY FEYDQ GNOSS  
PKUβ 693 GCGAGCTCTGCG AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
181 PVRGI PPAIR SPQNS HSHST  
PKUβ 753 CCGAGTCTGCG AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
201 PSSSV RPNSP SP TALA FGDH  
PKUβ 813 CCGAGTCTGCG AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
1 DLTIE  
PKUβ 221 PIVOP KOLSF KIIOT  
PKUβ 873 CCGAGTCTGCG AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
6 KISALONSKI SDLEK KEGRI  
PKUβ 241 LA--SN--ML--  
PKUβ 16 AAGATATCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
PKUβ 933 TGA--T--GT--A--TC CTA--C--G--A--C--T--  
26 DDLRLRANCDLRRDIEDQOKN  
PKUβ 251 F--  
PKUβ 76 GATGATTTATTAAGA GCGAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
PKUβ 893 GCGAGTCTGCG AGCAGTCTGCAAGT AGCAGTCTGCAAGT  
46 LEKYKERLNR CVTMS KLLI  
PKUβ 281 D--I--  
PKUβ 136 CTAGAGAAATCAAG GAGGATTAATAGA TGTGTGCAATGAGC AAGAACTCTTATA  
PKUβ 3030 ATACATCTTCAGCA TTGCGAGTTAATCT GCGAGGAAAGTA AGAACTGAATGAGC  
PKUβ 1053 TGCAGTCTGTTTT ATAGTAATAGGAATG T--

【図1E】

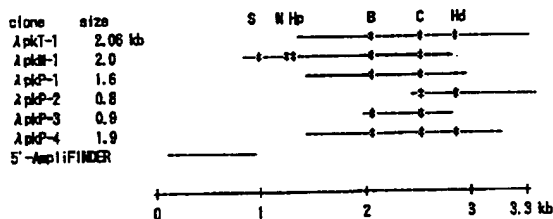
PKUβ 2670 TTCTTTTNTTTTT TTTTCTTACACAG AGCTGTTAAGAACT GTTGTGAAGTGAAG  
PKUβ 2730 TTTCTATATGTC TTTTATATGAGAGG ATCATGTCATGAA TAAATGCACTTCT  
PKUβ 2790 GACTATATTTTGG CAGTGAAGGAGGAT GACTCTGTTTACAC AGGAGCAGGATACC  
PKUβ 2850 ATGTTAGATAGAGG AAAAAATTTTGT TTGCGGAGCACT GTAAATAGCTTTAT  
PKUβ 2910 AATAGTTAATACAT TTGCTTBBAGTACA GAGTCTATATBA GGTATGTTTTCATT  
PKUβ 2970 ATTTAAACACATG GATTAATATGAGCA TATTTCTAATACAG AAGTATGTCCTGG  
PKUβ 3030 ATACATCTTCAGCA TTGCGAGTTAATCT GCGAGGAAAGTA AGAACTGAATGAGC  
PKUβ 3090 TGCAGTCTGTTTT ATAGTAATAGGAATG T--

pnl, NaeI, NruI, NcoI, PvuI, S  
cal, SacI, SacII, SnaI, SpeI, S  
phi, StuI, XhoIは無し。

【図1B】

PKUα 66 ESKKO EKNAC RDKSN DDRLR  
PKUβ 301 --T--LSS--E--  
PKUα 196 GAAAGTCAAAACAA GAGAGATGCGTGT AGAGATGAGCATG CAAGACGCTTGAGA  
PKUβ 1113 AGT-C--A-C-T-AA-C--G-T--T-A-AC-C  
PKUα 86 LGHFT TVRHG ASFTE QWTDG  
PKUβ 321 --V--Q--D--  
PKUα 256 CTGCGCACITTTACT ACTGTGAGACAGCA GCGTCAITTTACTGAA CAGTGGACAGATGT  
PKUβ 1173 -C-G--A-A-TA-T-C-T--A-  
PKUα 106 YAFON LIKOO ERINS OREEI  
PKUβ 341 F--V--Q--D--  
PKUα 316 TATGCTTTTCAGAT CTTATCAGCAGCAG GAAAGATTAATCA CAGAGGAGAGATA  
PKUβ 1233 -T-A--G-G--A-T-G-G-CAG-A-T-T  
PKUα 126 ERORK NLAKR KPPAM GQAP  
PKUβ 376 --L--V--Q--D--  
PKUα 329 GAAAGCACACGAAA ATGTTAGCAAAACCG AAGCTCTGCGATG GGTGAGGCGCT...  
PKUβ 1293 -G-A--C-TC--C-A-C--CA-AGCT AA-A-TTCT-AGGCA  
PKUα 145 PVTN EOKOR KSKT NGAEN  
PKUβ 380 -S--S--P--N-AV--  
PKUα 496 OCTCAGCAAT... GAGCAGAACAGCG AAGAGCAGCC... AATGAGCTGAAAT  
PKUβ 1353 -CT-T--TCT--CA-AA--A-AGCAGTC--G--  
PKUα 163 ET...LTLANEYHEO  
PKUβ 401 DPFVR PNLPO L--  
PKUα 487 GAAAC...TTAGCTTACA GAATACATGAACA  
PKUβ 1413 -TCCCTTTGTTAGA CCAATTTGCGACAA CTG-G--G--T--G--  
PKUα 174 EEIFK LRLGH LKKEE AEIOA  
PKUβ 421 --G--  
PKUα 520 GAAGAAATCTTCAA CTCAGTATGTCAT CTTAAAGAGGAGAA GCGAGATCAGGCA  
PKUβ 1473 --T--T-C--A--C--A-G--A-GA--  
PKUα 194 ELERLERVRN LHIRE LKRIH  
PKUβ 441 GAGCTGGAGACTA GAAAGCTTAAAT CTACATATCAGGAA CTAAGAGATACAT  
PKUα 580 -A-T-AC-TT-G--A-C-G--T-C-AC-T-G--G--A--C--  
PKUβ 1533 --A-T-AC-TT-G--A-C-G--T-C-AC-T-G--G--A--C--  
PKUα 214 NEDNS QFKDH PTLNDRYLL L  
PKUβ 461 --E--  
PKUα 640 AATGAGATTAATCA CAATTAAGATCAT CCAAGCTTAATGAC AGATATTTGTTGTA  
PKUβ 1593 -G-C--AT--A--A--AC-T--

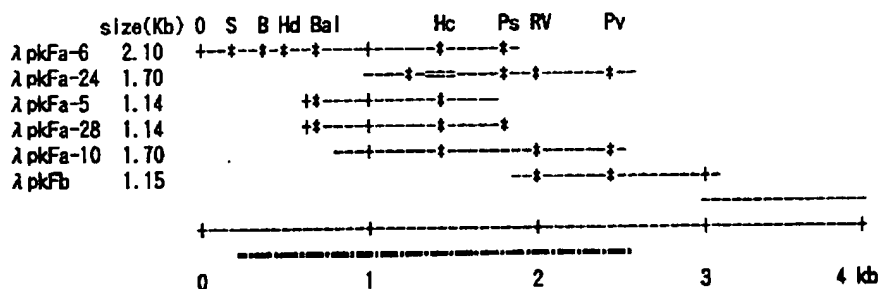
【図2】



【図 1 D】

PKU $\beta$	2190	-T- - - - -A- G- - - -T- C- C- G- -A-
PKU $\alpha$	434	S V G V I F Y Q C L Y G R K P F G H N Q
PKU $\beta$	580	-----
PKU $\beta$	1300	TGGTGGAGTGTGATC TTCTATCAGTGCTCT TATGGAAGAGAGCCT TTGCGCATTAACGC
PKU $\beta$	2250	-T- A- C- - - -T- A- A- -T- C- T- A-
PKU $\alpha$	454	S Q Q D I L Q E N T I L K V T E V O F P
PKU $\beta$	700	-----
PKU $\beta$	1360	TTCTCAGCAGCATCT CTACAGAGGATACG ATTCTTAAGCTACT GAGTCGAGTTCGGC
PKU $\beta$	2310	-T- C- A- C- - - -T- A- C- A- -T- A- T-
PKU $\alpha$	474	P K P V V T P E V K A F I R R C L A Y R
PKU $\beta$	720	-----
PKU $\beta$	1420	CGAAGCGAGCTAGTA ACACCTGAGGCAAG GCGTTATTATGAGA TGTCTGGCTACCGA
PKU $\beta$	2370	GT- A- G- T- -GAG- C- -A- C- -T- A- T-
PKU $\alpha$	494	K E D R I D V D O L A C D P Y L L P H I
PKU $\beta$	740	-----
PKU $\beta$	1480	AGGAGAGCGGCATG GATGTGACGAGCTG GCGTGTGATGCGTCA TTGTGTGCTTCACAT
PKU $\beta$	2430	-A- A- T- AT- -G- C- -A- C- A- -C- T- C- A-
PKU $\alpha$	514	R K S V S T S S P A A C D P Y L L P H I
PKU $\beta$	760	-R- N- S- S- G- N- L- H- M- G- L- T- A- A- S- P- T- P-
PKU $\beta$	1540	CGAAGTCTAGCTCTT ACAAGTACGCCCTCT GAGAGCTGATTGCA TCAACTCTGGGGG
PKU $\beta$	2490	-GA- AAT- T- GGAAGCTACAC ATG- GCGTGA- G- T- C- A- CAGCG-
PKU $\alpha$	534	S N H S S S N H 540
PKU $\beta$	780	P S S - I I T Y + 785
PKU $\beta$	1800	TCCATATCAGGCTTT TCTATTGAGACTAT CTCTACAGGCGACAA CTGTTTCAACACACAC
PKU $\beta$	2550	CGTCTTCAACGACATA ATTACTACTGACTT TCGTCGAGATGTGCG ATGTAGTCTTTTGAAT
PKU $\alpha$	1660	AAAGTGACAAATGG CGTTACAGCAGCGGTT TTGAGACATAGGMA TCGGATGATGCTCTA
PKU $\alpha$	1720	GAGAGCTCTTACAGC AGGCTATTTATTTCTT CAGCTCTTTTCCGATC CATAGAGCATGACAGC
PKU $\alpha$	1780	TATGATGCTTTCATGG AGGAGAAAGCTTGGC CAGCTCTGCGGCTGCT CTGTGAGGAAAGAGAG
PKU $\alpha$	1840	CCGCGCGGAGGCTTC AAGCTCAGCGCGCAC TGTGTGTGCGCTCTCT TCACTGAGGAGAAAA
PKU $\alpha$	1900	TATAAAGAGAGGCTG CGTTGACAGGATAGT GACCTTGAAGAACTCT CAGACTCAGGAGGAAA
PKU $\alpha$	1960	CGTTCTACAGACTGCT CTGATGAGAGATATG TGAATCTGAAGAACTCT GACCTGGCTGATGAAA
PKU $\alpha$	2020	GCTTCTATATTTTAAA CTTCTGTTTCTTTCTT TGACCTAGGTTTAGGT ACACCTCTCTGCGAAC
PKU $\alpha$	2080	GCTTCTACGACCAAG CTTAGACTGGGGAGT GTGTGTTGACTTGGGA TCAAAAGTGTGTGAAA
PKU $\alpha$	2140	TTTACCGGCTTAAAGC AGCAGAGTAGTAGTTT TTAATCTTAATAATAT GTTATTTTCTTTTAAAA
PKU $\alpha$	2200	CATGACAGCTCTTCTT CCGCTCTTTTATTTT TTGAAAGAGATAGAT TGGCATTTTGAAGAAA
PKU $\alpha$	2260	ACCGGCTATTAGCAG TACGCGGCATATGCT ATTGCATACAGACTG AGCTTTCTCTCGGDT
PKU $\alpha$	2320	CTGTGTTCTGCTTGTC CAATTCCTTGCGTCA TCTCGATAGGAGAAA AATTCAGTGGGAGTA
PKU $\alpha$	2380	CTGAGATGTGTGGTGT TTTTGCGATAGGAGTA AAGATAGAGTTTAGA AGACTTCAGACTTGGG
PKU $\alpha$	2440	GTCTCTTAGAGTGT CAGCTATTTTTCACAA ATTTGAGCACTCTG CCGTGTGCTCGTTTAT
PKU $\alpha$	2520	ATTATTTTGTGCTGT TATTTTATTTTAAAT AGGTTCACTCTGTCC
PKU $\beta$	2610	TTGCTTCAGATGCA CAGATGACACATTA GTTGTAGGACGATTG AGTGTGTGTTTCTT

【图3】



**NEW PROTEIN AND GENE THEREOF**

Patent Number: JP7132093  
Publication date: 1995-05-23  
Inventor(s): DATE TAKAYASU; others: 01  
Applicant(s): TAKAYASU DATE; others: 01  
Requested Patent: ☐ JP7132093  
Application Number: JP19930306095 19931112  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C12N15/09; C12N9/12  
EC Classification:  
Equivalents:

---

**Abstract**

---

**PURPOSE:** To obtain a new protein kinase and gene thereof useful for medicines/ diagnostics, by adsorbing a protein manifested by a prokaryote onto a film coated with a substrate followed by retrieving the intake activity of the phosphate group at gamma-site of ATP to conduct a cloning.

**CONSTITUTION:** Escherichia coli or the like is infected with the lambda gt10cDNA library of human-testis-placenta-melanoma and then cultured in an agar medium, and the resultant protein manifested is adsorbed onto a film coated with a substrate. The intake activity of the phosphate group at gamma-site of ATP into this substrate is assayed in terms of  $^{32}$ P intake using gamma- $^{32}$ P-ATP to retrieve kinase activity to conduct a cloning of a new protein kinase gene, thus affording the objective new protein and gene thereof useful as a medicine/diagnostic based on the in vivo function analysis of protein kinase.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2